

QM/MM法によるビリン還元酵素基質複合体構造に関する研究

¹茨城大院理工, ²モンクット王工科大学ラートクラバン校, ³茨城大理
○飯島愛璃¹, M. Paul Gleeson², 海野昌喜¹, 森聖治^{1,3}

Structural QM/MM Investigation of Bilin Reductase PcyA-substrate Complex.

○Eri Iijima¹, M. Paul Gleeson², Masaki Unno¹, Seiji Mori³

¹ Graduate School of Science and Engineering, Ibaraki University, Japan

² Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand

³ College of Science, Ibaraki University, Japan

【Abstract】 Phycocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase (PcyA), a member of the ferredoxin-dependent bilin reductase (FDBR) family, catalyzes two sequential reduction steps from biliverdin IX α (BV) to Phycocyanobilin (PCB). It plays a vital role of light-harvesting and photoreceptor pigment in cyanobacteria, algae and higher plants. PcyA controls the reaction sequence and regiospecificity of the BV reduction to afford PCB through an intermediate 18¹,18²-dihydrobiliverdin IX α (18EtBV). It also has a quite unique characteristic that is the only enzyme that catalyzes BV D-ring reduction among the FDBR family. Although the enzymatic feature has been studied experimentally and computationally from biological and chemical perspectives, the specific reaction mechanisms have not been clarified completely. A neutron structure of PcyA-BV complex was determined recently, and positions of the hydrogen atoms were revealed. Based on the neutron structure, we carried out ONIOM-EE calculations to investigate favorable protonation states for the neutron structure and reaction mechanism.

【序】 シアノバクテリアや植物などの光合成生物は、細胞内に光合成色素であるビリン色素を持っている。そのビリン色素を分子内に持つタンパク質は、シアノバクテリアなどで光合成の役割を担う。ビリン色素の一種であるフィコシアノビルン PCB は、ヘム分解産物であるビリベルジン IX α (BV)がフェレドキシン依存的な酵素 Phycocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase (PcyA) によって還元され、生成する。この反応では、BV の 2 箇所それぞれに 2 電子供与・2 つのプロトン付加が位置選択的に起こる。(Fig. 1.) 2015 年にシアノバクテリア由来の PcyA-基質複合体の中性子結晶構造解析¹が行われ、基質のプロトン化状態や水分子などを含む構造が明らかになった。PcyA の反応では Glu76 から BV の D-ring へのプロトン移動を第一段階として反応機構が提唱されている²が、中性子構造では Glu76 側鎖は脱プロトン化されていた。BV の 4 つのピロール環 N に結合した水素の占有率は、A 環と D 環で 1.0 であるのに対し、B 環で 0.8、C 環で 0.6 となっていた。この結果から、4 つのピロール環がプロトン化している構造と、中

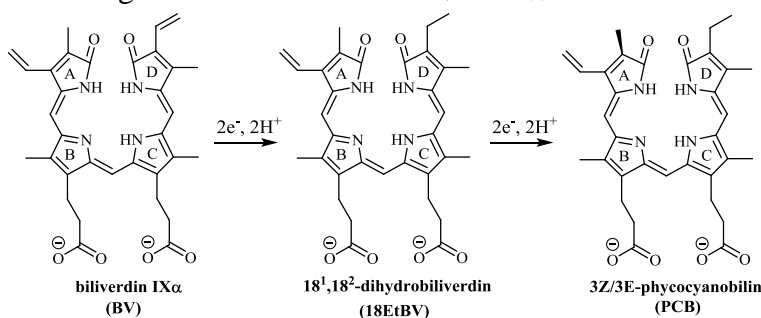


Fig. 1. Schematic representation of the reaction catalyzed by PcyA.

性の2種類の構造の混在が示唆された。そこで我々は、基質や周囲アミノ酸残基のプロトン化状態が活性部位にもたらす影響を研究するとともに、中性子実験で得られた構造が反応機構のどの段階の構造なのかを検討した。

【方法 (実験・理論)】

初期構造として、PcyA-BV 複合体の中性子結晶構造解析データ(PDBID:4QCD)を用いた。ONIOM 計算(ONIOM-EE(M06-2X/6-31G*))を用い、結晶水を含めたタンパク質全体構造(4491 原子)の中の QM 領域(138 原子)の構造最適化を行った。その後、より精度の高い 6-311+G**基底を用い、ONIOM-EE でエネルギー1点計算を行った。第一段階のプロトン移動が起きる前の構造(Model 1) 及び、Glu76 から BV 基質へプロトン移動したモデル(Model 3)の2種類を用い、基質及び周囲アミノ酸残基についてプロトン化状態の検討を行った。

【結果・考察】

Model 1 の QM/MM 計算より、C 環が脱プロトン化している中性の BV 構造が中性子結晶の構造に最も適していることが考えられる。Model 3 については、プロトン化している BV がエネルギー的に安定である結果が得られた。Model 1 と Model 3 の基質周囲アミノ酸残基の立体配置を考慮した結果、反応初期段階である Model1 が中性子構造により適していることが示唆された。さらに、実験で提案されたヒドロニウムイオンの安定性についての検討を 1C のモデルを用いて検討した。この安定性については、我々と独立に QM/MM 法による研究³が報告され、ヒドロニウムイオンが不安定であると示唆されている。

Table 1. Relative energies given from single point calculations (M06-2X/6-311+G**: AMBER) and Root Mean Square Deviation (RMSD) of heavy atoms in the active site.

QM model	Protonation State BV	QM/MM ΔE / kcal/mol	QM/MM(QM) ΔE / kcal/mol	RMSD [Å] (Heavy atom)
1A	Deprotonated A-ring	0.00	0.00	0.5878
1B	Deprotonated B-ring	1.49	-2.03	0.5669
1C	Deprotonated C-ring	-1.75	-2.59	0.5440
1D	Deprotonated D-ring	0.74	-0.42	0.5470
1E	Protonated BV	10.87	4.25	0.5855

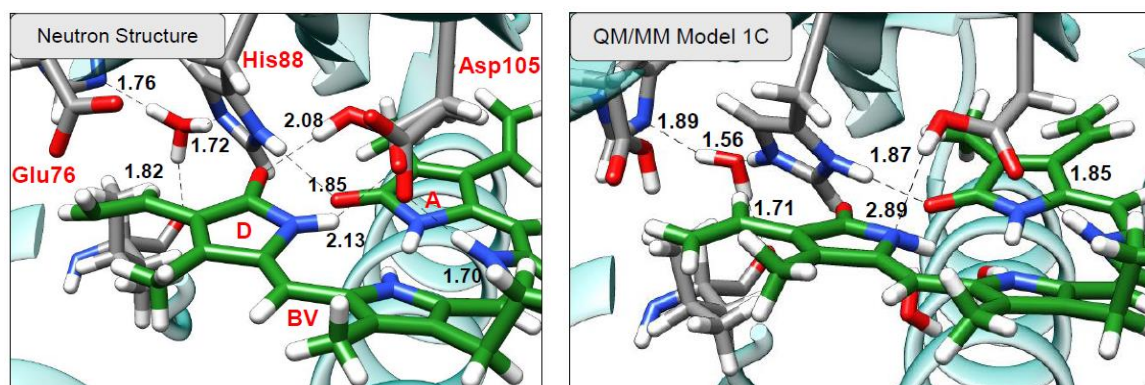


Fig. 2. Differences between neutron structure and ONIOM-EE optimized structure.

【参考文献】

- [1] Unno, M. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **137**, 5452 (2015).
- [2] Hagiwara, Y., Sugishima, M., Takahashi, Y., Fukuyama, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 27(2006)
- [3] Ikeda, T., Saito, K., Hasegawa, R., Ishikita, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 1 (2017)